

미요시근병증에서 Dysferlin의 면역세포화학검사와 Western Blot의 분석

안성의료원 신경과, 연세대학교 의과대학 신경과학교실^a, 병리학교실^b

오승헌 김승민^a 선우일남^a 김태승^b 최영철^a

Immunocytochemical and Western Blot Analysis in Miyoshi Myopathy

Seung-Hun Oh, M.D., Seung Min Kim, M.D.^a, Il Nam Sunwoo, M.D.^a,
Tai-Seung Kim, M.D.^b, Young-Chul Choi, M.D.^a

Department of Neurology, An-seong Medical Center, Anseong;

Departments of Neurology^a and Pathology^b, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Recent genetic analyses have shown that Miyoshi myopathy (MM) is caused by a mutation in the *DYSF*, which induces the dysfunction of dysferlin. We identified the deficiency of dysferlin by immunohistochemistry and Western blot in four patients with clinically diagnosed MM, and investigated the clinical and pathological characteristics of MM.

Methods: A muscle biopsy was performed in four patients who were diagnosed with MM by clinical and electrophysiological study. Immunostaining of muscle specimens for dysferlin, dystrophin, α , β , γ , δ -sarcoglycan, β -dystroglycan, and caveolin-3 were performed in all four patients. We analyzed the quantitative analysis for dysferlin by Western blot in three of four patients.

Results: All four patients showed clinical onset during adolescence or early adulthood (15-26 year old), a slowly progressive course, and a relatively high serum creatine kinase level (2240-6400 IU/L). Routine pathological studies showed non-specific myopathic changes. On immunocytochemistry, there was negative immunoreactivity for dysferlin on muscle specimens in all patients. The immunoreactivities for dystrophin, α , β , γ , δ -sarcoglycan, β -dystroglycan, and caveolin-3 were normal. On Western blotting, complete loss of dysferlin was noted in all three patients with MM.

Conclusions: Identification of isolated deficiency of dysferlin on immunocytochemistry or Western blot is important for the confirmative diagnosis of MM.

J Korean Neurol Assoc 23(4):490-495, 2005

Key Words: Miyoshi myopathy, Dysferlin, Immunocytochemistry, *DYSF*

서 론

미요시근병증(Miyoshi myopathy)은 10대 후반에서 30대 초반의 성인에서 시작되는 하지의 점진적인 근력 약화와 혈청 크레아틴 인산효소(creatine kinase; CK)의 높은 증가를 특징으

로 하는 상염색체 열성 원위부 근병증의 한 아형이다. 근력 약화는 대부분 하지의 비복근(gastrocnemius)에서 시작하여 보행장애를 호소하고 서서히 진행하며 경과는 다른 근병증에 비해 양호하다. 최근 유전학적 연구에서 미요시근병증은 2번 염색체 13.3 locus에 위치하는 *DYSF* (MIM*603009) 유전자의 돌연변이에 의해 유발된다고 알려져 있다.¹ *DYSF*의 돌연변이에 의해서 발생하는 근육병으로는 미요시근병증뿐만 아니라 제2B형 지대형 근이양증(limb-girdle muscular dystrophy type 2B; LGMD2B), 원위부 전방구획 근병증(distal anterior compartment myopathy) 등의 표현형(clinical phenotype)도 있어 이 질환들을 유전적 명명에 따라 dysferlinopathy로 분류하

Received November 25, 2004 Accepted January 27, 2005

* Young-Chul Choi, M.D.

Department of Neurology, Yongdong Severance Hospital
146-92 Dogok-dong, Gangnam-gu, Seoul, 135-270, Korea
Tel: +82-2-3497-3323 Fax: +82-2-3462-5904
E-mail: ycchoi@yumc.yonsei.ac.kr

기도 한다.^{2,3} 또한 동일한 *DYSF*의 돌연변이를 보이는 한 가족 내에서 미요시근병증과 제2형 근위지대형 근이양증이 혼합되어 나타나는 형질 다양성(phenotypical heterogeneity)을 보인다.⁴⁻⁶ *DYSF*의 돌연변이는 근세포막(sarcolemma)에 존재하는 단백질인 dysferlin의 이상을 초래하는데 dysferlin은 2080개의 아미노산으로 이루어져 있으며 6개의 C2 domain을 포함하고 C-terminus 근처에 한 곳의 transmembrane domain을 포함한다. C2 domain은 칼슘이 결합하는 부위를 가지고 있고 이 부위로 칼슘에 의해 매개되는 신호전달체계를 가진다.¹ Dysferlin은 세포 융합에 필요한 nematode (*Caenorhabditis Elegans*) spermatogenesis factor FER-1 단백질과 유전적으로 유사성을 가지는 것으로 보아 (27% identity, 57% similarity), 세포막을 구조적으로 안정화시키는 역할을 한다고 생각된다.^{7,8} 최근의 연구에서는 손상된 세포막의 복구에 필요한 세포막 융합 과정에 dysferlin이 중요한 역할을 한다고 보고하고 있다.⁹

미요시근병증은 Miyoshi 등이 처음 보고한 이래 주로 일본에서 많이 보고되고 현재까지 한국에서는 임상적으로 의심되는 2예가 보고되었다.^{10,11} 그러나 국내에서 면역세포화학검사(immunocytochemistry) 혹은 Western blot를 통하여 dysferlin의 결손을 확인한 예는 없다. 이에 저자는 임상적으로 의심되는 미요시근병증 환자 4명에서 면역세포화학검사와 Western blot를 하여 미요시근병증을 확인하였고 이에 임상적병리학적 특성을 보고하는 바이다.

대상과 방법

1. 환자 선별과 근육생검

임상적으로 미요시근병증으로 진단 받은 4명의 환자(환자 1-4)를 대상으로 환자의 동의 하에 근육생검을 하였다. 모든 환자에서 병력 청취, 신경학적검사, 임상병리검사 및 신경생리검사를 하였고, 신경전도검사(정상 신경전도속도(nerve conduction velocity)를 보이고 근전도검사(electromyogram)에서 근육병 소견을 보였다. 환자 1, 2, 3은 외측광근(vastus lateralis)에서, 그리고 환자 4는 상완이두근(biceps brachi)에서 부분 마취 하에 근육생검을 하여 동결시킨 후(frozen), 10 mm 두께 연속 절편을 hematoxylin & Eosin (H&E), modified Gomori Trichrome, NADPH-TR, ATPase PH 4.3/4.6/9.4 등으로 염색하였다.

2. 면역조직화학염색

4명에게서 얻은 근조직을 10 mm 연속 절편으로 잘라 아세트산으로 4℃에서 10분간 고정시키고 0.05 mol/L Tris-buffered saline (pH 7.5)으로 15분간 세척한 후 2% bovine serum albumin과 5% goat serum을 함유한 blocking solution에 30분간 incubation시켰다.¹² 이후 절편은 각각 dystrophin (NCL-DYS 1, NCL-DYS 2, NCL-DYS 3, 1:100 dilution, Novocastra), α -sarcoglycan (NCL- α -SARC, 1:100 dilution, Novocastra), β -sarcoglycan (NCL- β -SARC, 1:100 dilution, Novocastra), γ -sarcoglycan (NCL- γ -SARC, 1:100 dilution, Novocastra), δ -sarcoglycan (NCL- δ -SARC, 1:50 dilution, Novocastra), dysferlin (NCL-Hamlet, 1:20 dilution, Novocastra), β -dystroglycan (NCL- β -DG, 1:100 dilution, Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK), and caveolin-3 (1:50 dilution, Transduction Laboratory, Lexington, KU, USA)의 단클론 IgG 항체 (monoclonal IgG)와 함께 하루 동안 4℃ 환경 하에서 incubation시켰다. Incubation한 절편을 Tris-buffered saline으로 30분간 세척 후 peroxidase로 접합(conjugation)된 goat anti-mouse IgG를 사용하여 diaminobenzidine (DAB)-peroxidase 반응(Vector Laboratories, CA., USA.)을 유도하여 염색 여부를 관찰하였다.¹³

3. Dysferlin 단백질에 대한 Western blot

생검 조직이 부족한 한 명(환자 4)을 제외한 나머지 3명(환자 1-3)에서 이전에 보고된 실험 방법에 의거하여 dysferlin 단백질에 대한 정량적 검사를 하였다.¹⁴ 냉동 근육생검조직을 10-20 mm 두께의 냉동 절편(cryosection) 20개를 lysis buffer (Tris 125 mM, pH 6.8, 4% SDS, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 10 mM DTT, 0.5 mM PMSF) 200-300 μ l를 첨가하고 초음파 파쇄(sonication)하여 검체를 완전히 분쇄한 후 95℃에서 5분간 열처리하고 고속 원심분리 후 사용할 때까지 -20℃에 냉동 보관하였다. 보관된 검체를 Bradford 방법으로 정량한 다음 50 μ g의 단백질에 해당하는 lysate를 SDS-polyacrylamide gel에 점적하고 전기영동하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 transfer하였다. Membrane을 5% skimmed milk와 0.05% Tween-20가 함유된 TBS (0.5M NaCl, 25mM NaPb pH 7.4) 용액에서 blocking시킨 후 1차 항체 즉 anti-dysferlin antibody (1:1000, NCL-DYSF, Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK)를 TBS 용액에 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 2차 항체 ECL-anti-mouse IgG (1:5000, NA931, Amersham, UK)로 상온에서 1시간 반응시켰다. 세척 후 ECL (RPN2106,

Amersham, UK)로 1분간 반응 후 X-ray 필름으로 감광하여 band의 유무를 관찰하였는데 예상되는 dysferlin의 band 크기는 230 kDa였다.

결 과

1. 환자들의 임상적 특성(Table 1)

4명의 증상 발현은 15세에서 26세였고 내원 시 유병 기간은 4년에서 15년이였다. 첫 증상으로 3명은 계단을 오르내리기가 불편함을 호소하였고 1명은 보행장애를 호소하였다. 4명 모두 주로 하지 말단 부위의 근력 약화가 뚜렷하였고 비복근의 위축이 관찰되었다. 한 명(환자 2)은 상지의 근력 약화도 호소하였다. 근력 약화는 유병 기간에 비해 천천히 진행되는 양상을 보였다. 한 명(환자 2)은 15년 전부터 증상이 발현되었으나 현재 독립적으로 보행이 가능하였고 4명 환자 모두 검사 당시 일상 생활을 수행하는 데 경미한 장애를 호소하였다. 그 외에 안면근육의 침범이나 골격계의 이상은 관찰되지 않았다. 4명 모두 가족력상 이환된 가족 구성원은 없었다. 혈청학적검사에서는 4명 모두 혈청 CK가 증가되었다(2240–6400 IU/l).

2. 병리학적 소견(Table 2)

4명 모두 근육조직검사항 근육세포 내 내핵(internal nuclei)의 증가, 섬유 크기의 다양성(variation of fiber size), 섬유 괴사 및 퇴행성, 재생 섬유(degenerative and regenerative muscle fiber) 등이 관찰되어 비특이적인 근병증 소견을 보였다. 1명(환자 1)에서는 혈관 주위와 근세포 내 염증세포의 광범위한 침윤이 관찰되었고 괴사(necrosis)와 섬유화(fibrosis)도 일부 동반되었다(Fig. 1). 한 명(환자 3)에서는 염증세포의 침윤은 국소적으로 나타났다. 그 외에 fiber type predominance, rimmed vacuole 등은 관찰되지 않았다.

3. 면역세포화학 검사와 Western blot 소견

면역세포화학검사에서 4명 모두 근세포막에 dysferlin 항체에 대한 면역 염색이 소실되었다(Fig. 2). 반면 dystrophin, α , β , γ , δ -sarcoglycan, β -dystroglycan, caveolin-3에 대한 항체 반응은 정상적으로 발현되었다. Western blot에서는 검사를 시행한 3명 모두 dysferlin에 해당하는 230 kDa 크기의 band가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

Table 1. The clinical and laboratory characteristics of four patients with Miyoshi myopathy

Patient No.	Sex / Age	Age of onset (yrs)	Duration (yrs)	Distribution of muscle weakness						Calf muscle atrophy	Serum CK level (IU/L)
				Face	Neck	U/Ex		L/Ex			
						Proximal	Distal	Proximal	Distal		
1	M/20	15	5	-	-	5	5	4+	4	++	6400
2	M/41	26	15	-	-	4+	4+	4+	4	+	4000
3	F/38	26	12	-	-	5	5	5	4+	+	2240
4	F/22	18	4	-	-	5	5	4+	4	+	5300

U/Ex; upper extremity, L/Ex; lower extremity, CK; creatine kinase

Table 2. Routine pathological findings in patients with Miyoshi myopathy

	Pt 1	Pt 2	Pt 3	Pt 4
Increased internal nuclei	+	+	+	+
Variation of fiber size	+	++	+	+
Degenerative muscle fiber	+	+	+	+
Regenerative muscle fiber	+	+	+	+
Inflammatory cell infiltration	++ (widespread)	-	+	-
Fiber type predominance	-	-	-	-
Fibrosis	+	+	+	+
Rimmed vacuole	-	-	-	-

Pt; patient number, +; present, ++; prominent, -; absent

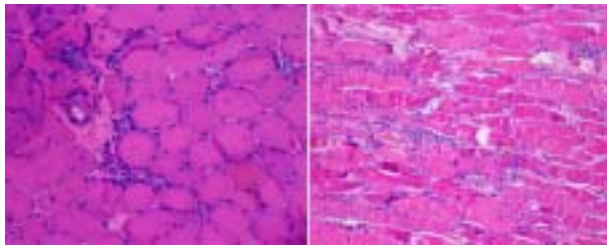


Figure 1. Pathology of vastus lateralis muscle in a patient with Miyoshi myopathy (patient 1). There are perivascular and endomysial infiltration of inflammatory cells with necrotic and regenerative fibers (H&E, left= $\times 200$, right= $\times 100$, magnification).

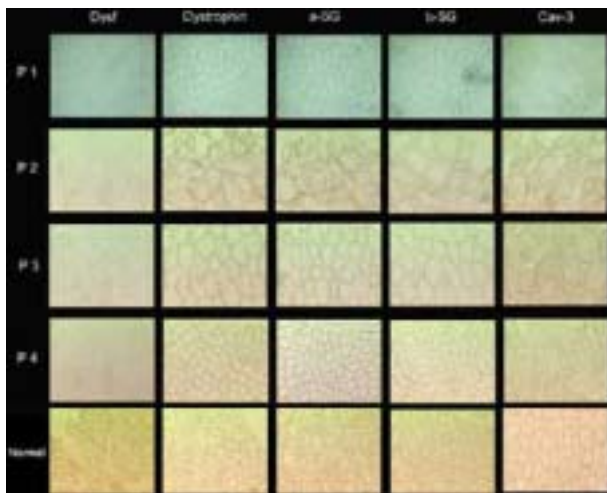


Figure 2. Immunostaining in normal control and four patients with Miyoshi myopathy. Dysf; dysferlin, SG- α ; α -sarcoglycan, SG- β ; β -sarcoglycan, Cav-3; caveolin-3, β -DG; β -dystroglycan (β -DG) ($\times 200$ magnification)



Figure 3. Western blot for dysferlin in three patients (Patient 1-3) with Miyoshi myopathy. 230 kDa band for dysferlin is absent in all three patients comparing with normal control (NL).

고찰

본 연구의 대상인 4명 모두 발병 시기, 근력 약화의 양상, 임상 증상에 비해 현저히 증가된 혈청 CK 수치 등을 보여 미요시근병증의 전형적인 임상 양상을 나타내었다. 이전의 보고에서 미요시근병증 환자들은 10년 이내에 휠체어에 의존하는 환자가 전체의 10% 미만으로 보고하고 있어 비교적 양호한 예후를 보이며 그에 비해 진단 초기부터 혈청 CK 수치는 현저히 증가되는 특징적 양상을 보였다.¹⁵ 이는 dysferlin이 비교적 빠르게 진행되는 근이양증을 유발하는 dystrophin이나 sarcoglycan과는 다른 기전으로 근세포막의 구조적 안정성에 관여함을 시사한다. 최근의 연구에서 dysferlin이 결핍되면 손상된 세포막을 복구하는 과정에서 막 융합에 장애가 생겨 근세포 자체의 파괴보다는 막 안정성이 약화되어 근세포막에 존재하는 CK가 누출되어("CK leak") 근력 약화에 비해 혈청 CK가 매우 증가하는 소견을 보인다고 추측된다.¹⁶

미요시근병증 환자들은 조직검사에서 비특이적인 근병증 소견을 보인다. 일부의 환자에서 type I fiber predominance를 관찰할 수 있으나 미요시근병증에서만 나타나는 특징적 소견은 아니다. 한 연구에서 dysferlinopathy 환자들의 조직검사상 약 10-20%에서 혈관 주위와 근세포 내 염증세포의 침윤이 관찰된다고 보고하였다.¹⁷ 본 연구 대상중 2명의 근육 조직에서 염증세포의 침윤이 관찰되었는데 한 환자에서 혈관 주위와 근세포 내 염증세포의 침윤은 광범위하게 관찰되어 염증성 근병증(inflammatory myopathy)과 감별이 요구되었다. 그러므로 임상적으로 원위부 근병증이 의심되는 젊은 성인에서 근조직검사상 염증세포의 침윤이 관찰되면 면역세포화학검사로 dysferlin의 결핍 유무를 확인하여 염증성 근병증과 미요시근병증을 감별하는 것이 중요하다고 생각된다.

본 연구에서 미요시근병증 환자 모두에서 세포막에 dysferlin이 결손되어 있었고 Western blot상에서도 dysferlin이 소실되어 있음을 확인하였다. 면역세포화학검사에서 dysferlin의 현저한 감소 혹은 소실됨으로 진단할 수 있으며 대부분의 미요시근병증 환자들의 근조직검사상 근세포막에서 dystrophin, sarcoglycan, dystroglycan, caveolin-3의 발현은 정상적으로 관찰된다. 이는 dysferlin이 이들 세포막에 안정성에 관여하는 단백질들과는 다른 기전으로 근세포막의 안정성에 기여함을 시사한다. 미요시근병증을 포함한 primary dysferlinopathy에서는 대부분 dysferlin은 거의 소실되어 있거나 그 양이 현저히 감소(정상인의 30% 이하)되어 있다.^{14,18} 그러나 sarcoglycanopathy나 caveolinopathy 등 다른 근골격계 질환의 일부 환자에서도 dysferlin이 일부 감소되었거나 비정상적인 분포 양상을 나타

낼 수도 있기 때문에 주의를 요한다.^{19,20} 따라서 dysferlin이 거의 소실되어 있거나 현저히 감소되어 있는 경우 진단에 문제는 없으나 dysferlin 양이 일부 감소되어 있는 경우에는(>30% 이상 발현되는 경우) dysferlin을 포함한 다른 근세포에 관여하는 단백질들과 같이 면역조직화학검사를 통해서 primary dysferlinopathy인지 다른 질환에 동반된 dysferlin의 이차적 감소(secondary dysferlinopathy)인지 감별하는 것이 중요하다. 최근의 연구에서 caveolin-3가 dysferlin과 상호 작용을 통하여 막 안정성에 관여한다고 보고되고 있는데, caveolin-3는 CAV3 유전자의 이상으로 우성 유전 양상을 띠는 근위지대형 근이영양증 1C형(LGMD 1C)을 유발한다고 알려져 있다.^{20,21} 본 연구에서 caveolin-3의 발현은 정상적으로 관찰되었으나 Dysferlinopathy 환자의 일부에서 caveolin-3의 감소를 관찰할 수 있기 때문에 dysferlin과 caveolin은 면역세포화학검사를 병행해야 할 필요성이 있다.²²

DYSF는 55개의 exon으로 이루어져 있고 DYSF의 돌연변이는 현재까지 약 45개 이상 보고되고 있으며 변이 양상 또한 과오 돌연변이(missense mutation), 무의미 돌연변이(nonsense mutation), 결손(deletion), 삽입(insertion) 등으로 매우 다양하다. 이러한 변이의 차이와 임상 증상 간의 차이는 관련성이 없다고 보고되어 있다.^{18,23,24} 본 연구에 참여한 한 명(환자1)에서 DYSF의 12번째 exon의 1165번째 염기서열에서 guanine (G)이 cytosine (C)으로 동형접합성(homozygous) 치환이 관찰되었다.²⁵ 이는 DYSF의 389번째 단백질을 합성하는 부분에서 GAG가 CAG로 변하여 glutamic acid (E)가 glutamine (Q)으로 치환되게 하였다. 미요시근병증을 확진하기 위해서는 유전자검사로 DYSF의 돌연변이를 확인해야 하지만 DYSF의 exon 자체가 크고 돌연변이의 hotspot이 없이 각각의 exon에서 골고루 돌연변이가 나타나기 때문에 선별검사로 유전자검사를 하기에는 시간적, 경제적인 부담이 많다.²³ Dysferlin 단백질의 결손을 면역세포화학검사나 Western blot를 통하여 단백질의 소실 혹은 30% 이하로 결핍되어 있으면 primary dysferlinopathy로 진단할 수 있으므로 임상 증상으로 미요시근병증이 의심되면 선별검사로 면역세포화학검사나 Western blot를 하는 것이 효과적이라고 생각한다.

결론적으로, 저자들은 면역세포화학검사와 Western blot를 통하여 진단된 미요시근병증 환자들의 임상적, 병리학적, 면역세포학적 특성을 분석하였다. 특히 면역조직화학검사는 염증성 근육병 및 근이영양증 환자의 감별진단법이며, 이러한 검사를 통해서 향후 더 많은 dysferlinopathy 환자를 진단할 수 있을 것이고 이 환자들을 대상으로 임상적·병리학적 특성을 비교, 연구하는 것이 중요할 것이다.

REFERENCES

1. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20:31-36.
2. Ueyama H, Kumamoto T, Nagao S, Masuda T, Horinouchi H, Fujimoto S, et al. A new dysferlin gene mutation in two Japanese families with limb-girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Neuromuscul Disord* 2001;11:139-145.
3. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001;49:130-134.
4. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Tanaka H, Vereshchagin NV, Markova ED, Poleshchuk VV, et al. Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain* 1996;119:1895-1909.
5. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylen E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* 2000;55:1931-1933.
6. Weiler T, Bashir R, Anderson LV, Davison K, Moss JA, Britton S, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet* 1999;8:871-877.
7. Britton S, Freeman T, Vafiadaki E, Keers S, Harrison R, Bushby K, et al. The third human FER-1-like protein is highly similar to dysferlin. *Genomics* 2000;68:313-321.
8. Argon Y, Ward S. Caenorhabditis elegans fertilization-defective mutants with abnormal sperm. *Genetics* 1980;96:413-433.
9. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003;423:168-172.
10. Hong SC, Kim BJ, Lee EA, Suh YL. Distal myopathy of Miyoshi type: 1 case. *J Korean Neurol Assoc* 1999;17:916-919.
11. Lee YH, Park KJ, Lee KS, Lee LN, Kim DS, Choi NC, et al. A case of Miyoshi type distal myopathy. *J Korean Neurol Assoc* 2001;19:555-557.
12. Choi YC, Park GT, Kim TS, Sunwoo IN, Steinert PM, Kim SY. Sporadic inclusion body myositis correlates with increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2. *J Biol Chem* 2000;275:8703-8710.
13. Oh SH, Kang SW, Lee JG, Na SJ, Kim TS, Choi YC. Clinical and pathological characteristics of four Korean patients with Limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *J Korean Med Sci* 2004;19:447-452.
14. Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH Jr. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* 1999;53:1119-1122.
15. Linssen WH, Notermans NC, Van der Graaf Y, Wokke JH, Van Doorn PA, Howeler CJ, et al. Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain* 1997;120:1989-1996.
16. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH Jr. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and

- mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 2003;278:50466-50473.
17. Gallardo E, Rojas-Garcia R, de Luna N, Pou A, Brown RH Jr, Illa I. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 2001;57:2136-2138.
18. Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, et al. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 2003;211:23-28.
19. Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol* 2000;48:902-912.
20. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 2001;10:1761-1766.
21. Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999;122:1403-1420.
22. Walter MC, Braun C, Vorgerd M, Poppe M, Thirion C, Schmidt C, et al. Variable reduction of caveolin-3 in patients with LGMD2B/MM. *J Neurol* 2003;250:1431-1438.
23. Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM, et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 2001;57:271-278.
24. Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Kondo E, Mizuno T, Onodera Y, et al. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype. *Neurology* 2003;60:1799-1804.
25. Oh SH, Kim TS, Choi YC. Identification of a dysferlin gene mutation in a Korean case with Miyoshi myopathy. *Yonsei Med J* 2004;45:927-930.